

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl<sup>7</sup>

A61F 2/28

A61L 27/00

## [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 00132082.3

[43] 公开日 2001 年 7 月 25 日

[11] 公开号 CN 1304711A

[22] 申请日 2000.12.15 [21] 申请号 00132082.3

[71] 申请人 华西医科大学附属第一医院

地址 610041 四川省成都市外南国学巷 37 号

[72] 发明人 杨志明 秦廷武

[74] 专利代理机构 华西医科大学专利事务所

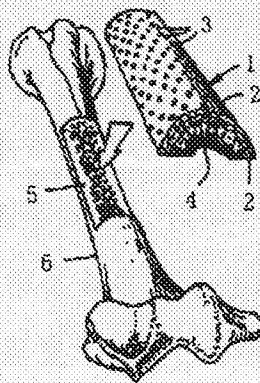
代理人 岳 英

权利要求书 2 页 说明书 4 页 附图页数 2 页

[54] 发明名称 生物衍生组织工程骨及其制备方法

[57] 摘要

本发明涉及生物衍生组织工程骨,是人体组织修复的材料。采用物理化学处理方法,将来源于猪骨或异体骨制成生物衍生骨支架,保留天然骨的无机或部分有机成分所形成的天然网状结构及基本生物力学性能,引入可生物降解的高分子材料、蛋白质、多肽或氨基酸、生长因子类的物质,种植人胚胎成骨细胞或骨髓基质干细胞,构建有生命的生物衍生组织工程骨,用于临床上修复骨缺损。



ISSN 1008-4274

知识产权出版社出版

## 权 利 要 求 书

1. 一种生物衍生组织工程骨,其构成的特征在于:猪骨或异体骨制成基本去除抗原性和细胞成分,保留基本框架的生物衍生骨支架[1],该生物衍生骨支架有三类:部分脱蛋白生物衍生骨支架、完全脱蛋白生物衍生骨支架和部分脱钙生物衍生骨支架;在上述生物衍生骨支架表面修饰有可生物降解的高分子材料、蛋白质、多肽或氨基酸、生长因子类的物质[2],和接种其上的胚胎成骨细胞或骨髓基质干细胞[3],构建出生物衍生组织工程骨[4],用于修复骨缺损[5],重建宿主骨[6]的结构和功能。
2. 一种制备权利要求1生物衍生组织工程骨的方法,其特征在于:
  - 2.1 制备部分脱蛋白生物衍生骨支架的方法是:取新鲜猪骨或异体骨,去除其所附软组织、中心骨髓及软骨部分,蒸馏水冲洗干净,于38℃ 30%过氧化氢中脱脂72小时,每24小时换液一次;蒸馏水浸洗干净,于75%酒精中去除残余过氧化氢24小时,蒸馏水浸洗干净;氯仿:甲醇为3:1,于室温下部分脱蛋白4小时,蒸馏水清洗;在-38℃,  $10^{-5}$ Pa条件下冷冻干燥24小时;25KGY  $\gamma$ 射线辐射处理消毒并清除剩余胶原蛋白的抗原性,最后获得部分脱蛋白生物衍生骨支架;
  - 2.2 制备完全脱蛋白生物衍生骨支架的方法是:取新鲜猪骨或异体骨,去除其所附软组织、中心骨髓及软骨部分,蒸馏水冲洗干净,于38℃ 30%过氧化氢中脱脂48小时,每24小时换液一次;蒸馏水浸洗干净,氯仿:甲醇为3:1,于室温下部分脱蛋白4小时,蒸馏水清洗;入110℃ 乙二胺中循环提取24小时,蒸馏水浸洗干净,于室温下入乙醇中浸泡24小时,除去残余乙二胺,蒸馏水清洗;在-38℃,  $10^{-5}$ Pa条件下冷冻干燥24小时;于20~50℃下经环氧乙烷灭菌3~9小时,最后获得完全脱蛋白生物衍生骨支架;
  - 2.3 制备部分脱钙生物衍生骨支架的方法是:取新鲜猪骨或异体骨,去除其所附软组织、中心骨髓及软骨部分,蒸馏水冲洗干净,于38℃ 30%过氧化氢

中脱脂 48 小时,每 24 小时换液一次;蒸馏水浸洗干净,入 0.6M 盐酸在 4℃ 下部分脱钙 72 小时,每 24 小时换液一次,蒸馏水浸洗干净;入乙醇中浸泡 4 小时,除去残余过氧化氢;氯仿:甲醇为 3:1,于室温下部分脱蛋白 4 小时,蒸馏水清洗;在 -38℃,  $10^{-5}$  Pa 条件下冷冻干燥 24 小时;25KGY  $\gamma$  射线辐射处理消毒并清除剩余胶原蛋白的抗原性。最后获得部分脱钙生物衍生骨支架;

上述三类制备的骨支架保存原来骨组织的基本框架,具有一定的生物力学功能,基本去除抗原性;

2.4 在上述三类生物衍生骨支架上进行支架表面修饰,引入可生物降解的高分子材料、蛋白质、多肽、氨基酸序列、生长因子类的物质;

2.5 在上述三类生物衍生骨支架上采用胚胎成骨细胞或骨髓基质干细胞与制作的生物衍生骨支架复合培养,构建生物衍生组织工程骨,用于临床修复骨缺损。

## 说 明 书

## 生物衍生组织工程骨及其制备方法

本发明涉及骨组织修复的材料,特别是经过物理、化学方法处理过的生物衍生骨支架,复合胚胎成骨细胞或骨髓基质干细胞构建的生物衍生组织工程骨。

组织工程学是采用生命科学和工程学的基本原理和方法,构建人体组织(器官),以修复、替代因创伤、疾病而无功能的组织(器官)。组织工程骨研究的关键问题是种子细胞和支架材料。种子细胞包括胚胎成骨细胞、组织干细胞等。在支架材料方面,过去多以无机材料(如羟基磷灰石、生物玻璃陶瓷、磷酸三钙等)、有机材料(如聚乳酸、聚羟基乙酸及二者共聚物等)或有机与无机材料复合构建组织工程骨支架,与细胞复合培养后,形成组织工程骨。人工合成材料的生物相容性、生物活性、生物降解性及与宿主骨的力学匹配等方面还存在一些缺点,且在孔隙率及孔径大小等方面的仿生制作还有一定难度(见 Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. Science, 1993; 260(5110): 920~926),同时某些人工材料(如聚乳酸等)大量使用时在体内降解过程中产生的酸性物质堆积,不利于细胞的附着、分裂、增殖;有的材料(如陶瓷类材料)碎性大,易断裂,在体内降解十分缓慢,以致成为异物,不能被机体接受,因此,支架材料已成为妨碍组织工程骨研究进程的重大问题。

早在 80 年代就有生物衍生材料的研究,如牛骨来源的重组异种骨材料,经临床试用获得一定成功。但牛与人的同源性差距较大,并不是理想的供体。最近的研究发现,猪与人在遗传背景上有 96% 以上的同源性,同时还发现,猪的主要结缔组织(如骨等)和周围神经未发现超急排斥靶抗原存在或仅有微弱表达(见李涛,李幼平,杨志明. 猪到人异种移植抗原与移植免疫研究. 中国修复重建外科杂志, 1998; 12(1): 42~46)。

同种异体骨移植已有 60 年左右的临床应用历史,过去主要用冷冻或硫柳汞处理,但临床骨移植疗效差异很大。最近的报道长骨缺损的修复其并发症发

生率达 36.7% (见刘建中,王臻,胡蕴玉等.异体骨关节移植修复肢体大段骨缺损的术后并发症.中华外科杂志,2000;38(5):332~335),主要原因是保存了异体骨的抗原性和没有生物活性。冷冻骨移植平均愈合时间长达 7~9 个月。

本发明意于改进现有技术中的不足,采用物理和化学的方法将异体骨和猪骨制成组织工程骨的支架,复合细胞后构建生物衍生组织工程骨,用于临床上修复骨缺损。

本发明的生物衍生组织工程骨,由猪骨或异体骨制成基本去除抗原性和细胞成分,保留基本框架的衍生组织工程骨支架,表面修饰可生物降解的高分子材料、蛋白质、多肽、生长因子类的物质,和接种其上的胚胎成骨细胞或骨髓基质干细胞组成。

上述生物衍生骨支架的制备方法,(1)是用猪或异体骨采用物理化学方法制备三类衍生组织工程骨支架,即部分脱蛋白生物衍生骨支架、完全脱蛋白生物衍生骨支架和部分脱钙生物衍生骨支架,其具体制备方法见说明书附图 3、4 和 5,制备的骨支架保存原来骨组织的基本框架,具有一定的生物力学功能,基本去除抗原性;(2)在生物衍生骨支架上进行表面修饰,引入可生物降解的高分子材料、蛋白质、多肽或氨基酸序列、生长因子类的物质;(3)采用胚胎成骨细胞和骨髓基质干细胞与制作的生物衍生骨支架复合培养,构建生物衍生组织工程骨,用于临床修复骨缺损。

本发明与现有技术相比具有如下优点:

1. 采用物理化学方法制备的生物衍生骨支架,其抗原性较弱,有良好的组织亲和性和结合力,其天然的孔隙结构、大小和形态端正,为种子细胞的粘附、增殖、分化、成骨提供天然的三维生长空间结构。这种材料来源丰富,制作简便,易于塑形,并在功能适应性、组织相容性、理化性能、生物降解性、造价等方面优于人工合成材料。

2. 生物衍生骨支架本身具有良好骨诱异性和骨引导性,进一步复合表面修饰物质后,为种子细胞粘附、增殖及发挥成骨作用提供好的微环境。

3. 利用上述的良好支架材料,复合种子细胞后,成为有生命的生物衍生组

织工程骨,可广泛用于临床上修复骨缺损。

以下是说明书附图的图面说明:

图1和图2是本发明的结构示意图。图中1为生物衍生骨支架;2为支架表面修饰物质;3为种子细胞;4为构建的生物衍生组织工程骨;5为骨缺损;6为宿主骨。

图3是本发明部分脱蛋白生物衍生骨支架的制备方法。

图4是本发明完全脱蛋白生物衍生骨支架的制备方法。

图5是本发明部分脱钙生物衍生骨支架的制备方法。

实施例1. 一种生物衍生组织工程骨及其制备方法,参见附图1、2和3:是一类制备部分脱蛋白生物衍生骨支架的方法:取新鲜猪骨或异体骨,去除其上所附软组织、中心骨髓及软骨部分,蒸馏水冲洗干净,于38℃ 30%过氧化氢中脱脂72小时,每24小时换液一次;蒸馏水浸洗干净,于75%酒精中去除残余过氧化氢24小时,蒸馏水浸洗干净;氯仿:甲醇为3:1,于室温下部分脱蛋白4小时,蒸馏水清洗;在-38℃,  $10^{-5}$ Pa条件下冷冻干燥24小时;25KGY  $\gamma$ 射线辐射处理消毒并清除剩余胶原蛋白的抗原性,最后获得部分脱蛋白生物衍生骨支架[1];再将上述生物衍生骨支架进行表面修饰,引入有胶原蛋白、多肽等物质[2],采用胚胎成骨细胞或骨髓基质干细胞[3]与制作的生物衍生骨支架复合培养,构建生物衍生组织工程骨[4],用于修复骨缺损[5],重建宿主骨[6]的结构和功能。

实施例2. 一种生物衍生组织工程骨及其制备方法,参见附图1、2和4:是一类制备完全脱蛋白生物衍生骨支架的方法:取新鲜猪骨或异体骨,去除其上所附软组织、中心骨髓及软骨部分,蒸馏水冲洗干净,于38℃ 30%过氧化氢中脱脂48小时,每24小时换液一次;蒸馏水浸洗干净,氯仿:甲醇为3:1,于室温下部分脱蛋白4小时,蒸馏水清洗;入110℃ 乙二胺中循环提取24小时,蒸馏水浸洗干净,于室温下入乙醇中浸泡24小时,除去残余乙二胺,蒸馏水清洗;在-38℃,  $10^{-5}$ Pa条件下冷冻干燥24小时;于20~50℃下经环氧乙烷灭菌3~9小时,最后获得完全脱蛋白生物衍生骨支架[1];再将上述生物衍生骨支架进行



表面修饰,引入可生物降解的高分子材料聚乳酸、胶原蛋白、氨基酸序列 RGD 等[2],采用胚胎成骨细胞或骨髓基质干细胞[3]与制作的生物衍生骨支架复合培养,构建生物衍生组织工程骨[4],用于修复骨缺损[5],重建宿主骨[6]的结构和功能。

实施例 3. 一种生物衍生组织工程骨及其制备方法,参见附图 1、2 和 5:是一类制备部分脱钙生物衍生骨支架的方法:取新鲜猪骨或异体骨,去除其上所附软组织、中心骨髓及软骨部分,蒸馏水冲洗干净,于 38℃ 30% 过氧化氢中脱脂 48 小时,每 24 小时换液一次;蒸馏水浸洗干净,入 0.6M 盐酸在 4℃ 下部分脱钙 72 小时,每 24 小时换液一次,蒸馏水浸洗干净;入乙醇中浸泡 4 小时,除去残余过氧化氢;氯仿:甲醇为 3:1,于室温下部分脱蛋白 4 小时,蒸馏水清洗;在 -38℃,  $10^{-5}$  Pa 条件下冷冻干燥 24 小时;25KGY  $\gamma$  射线辐射处理消毒并清除剩余胶原蛋白的抗原性,最后获得部分脱钙生物衍生骨支架[1];再将上述生物衍生骨支架进行表面修饰,引入可生物降解的高分子材料聚羟基乙酸、生长因子 IGF-1 等物质[2],采用胚胎成骨细胞或骨髓基质干细胞[3]与制作的生物衍生骨支架复合培养,构建生物衍生组织工程骨[4],用于修复骨缺损[5],重建宿主骨[6]的结构和功能。

实施例 4. 取新鲜同种新鲜肋骨应用实施例 1 所制得的一种生物衍生组织工程骨,采用自体骨髓基质干细胞与生物衍生骨支架复合构建,用于修复因肿瘤切除所致 3 条肋骨缺损,重建了胸廓支架,术后心肺功能恢复良好。

实施例 5. 取新鲜同种异体骨应用实施例 2 所制得的一种生物衍生组织工程骨,采用同种异体胚胎成骨细胞与生物衍生骨支架复合构建,用于修复股骨缺损,术后愈合良好,无明显组织反应。

实施例 6. 取新鲜同种异体骨应用实施例 3 所制得的一种生物衍生组织工程骨,采用同种异体胚胎成骨细胞与生物衍生骨支架复合构建,用于修复尺、桡骨上 1/3 陈旧骨折畸形愈合、切骨矫正后植骨,术后未发现明显组织反应,达到骨性愈合。

## 说明书附图

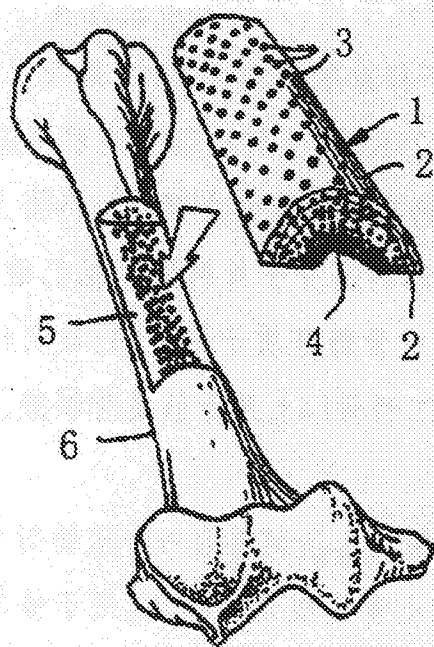


图 1

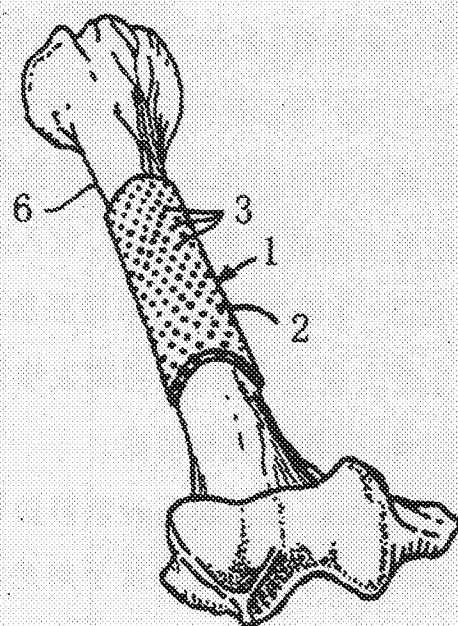


图 2



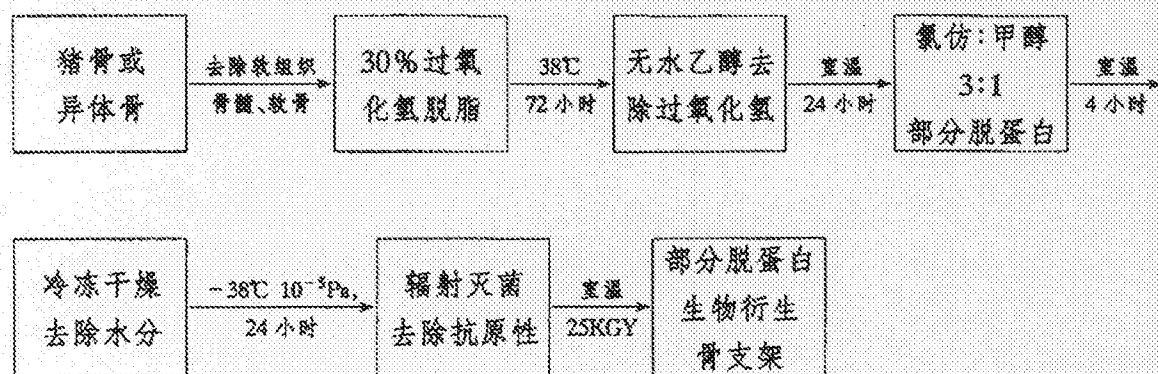


图 3

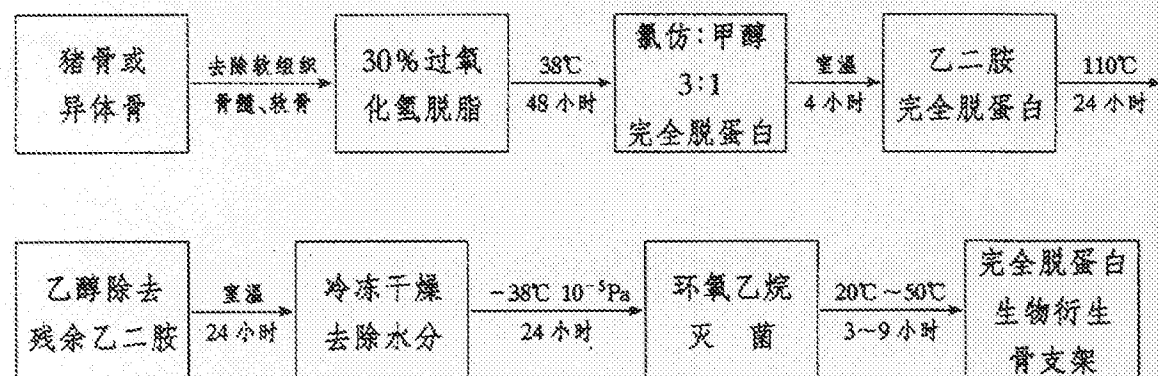


图 4

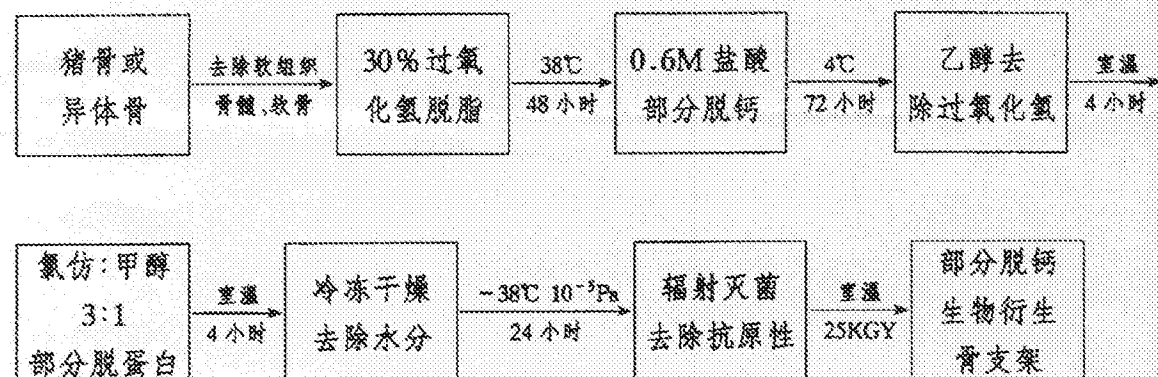


图 5